OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA
LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

66.

E. BALDACCI

Studi sulla fitoimmunità acquisita attiva

Estratto dal Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa
Volume VIII - Anno 1932

PISA
TIPOGRAFIA EDITRICE PACINI MARIOTTI

1932 - XI

E. BALDACCI

Studi sulla fitoimmunità acquisita attiva

Estratto dal Bollettino del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa
Volume VIII - Anno 1932

PISA
TIPOGRAFIA EDITRICE PACINI MARIOTTI

1932 - XI

E. BALDACCI

Studi sulla fitoimmunità acquisita attiva

Durante il I Congresso della Società Internazionale di Microbiologia tenutosi a Parigi nel 1930, alla relazione su « L' immunità nelle piante » presentata dal Prof. D. Carbone, fu mossa da alcuni fitopatologi qualche obbiezione relativa, sopratutto, al meccanismo dell' immunità acquisita attiva. Una delle obbiezioni, presa in considerazione dal relatore e successivamente sottoposta a prova sperimentale, fu quella avanzata dallo Haumann, il quale dichiarò che una qualche resistenza nelle piante vaccinate dovesse attribuirsi alla presenza dei liquidi colturali in cui sviluppa il microrganismo patogeno, in essa iniettati ed usati, nella generalità dei casi come mezzo vaccinante.

L' infezione sarebbe impedita, in altri termini, non da una reazione istogena della pianta, ma semplicemente dal liquido colturale assorbito.

Recenti prove di Jarach, istituite per suggerimento dello stesso Prof. Carbone, per le conclusioni cui pervengono, non dimostrerebbero giustificate le opinioni di Haumann.

Jarach (1) condusse le proprie esperienze vaccinando giovani piantine di fagiuolo contro la cosidetta « toile », forma

(1) Phytopathologische Zeitschrift, B. IV, H. 3, 1932.

asporigena e parassita della *Botrytis cinerea,* con il liquido di coltura (infuso di malto) filtrato per candela Berkfeld o con i feltri micelici triturati ed uccisi con etere. La mortalità verificatasi alla prima infezione fu del 60 % per le piante non vaccinate, del 37 % per le piante vaccinate con liquido filtrato al Berkfeld, del 50 % per le piante vaccinate con micelio. Alla seconda infezione, eseguita sui controlli e sulle piante vaccinate con filtrato, si verificò la morte delle piante di controllo.

Risultò evidente, quindi, una certa immunizzazione, ma in percentuale non grande, poichè alla prima inoculazione resistette bene il 40 % delle piante controllo, contro il 60 % delle piante vaccinate. Il fatto poi, che alla seconda inocuzione le superstiti piante controllo primamente infettate non si mostrarono alcunchè resistenti, dimostrerebbe che la prima infezione non ebbe effetto vaccinante.

Le altre prove condotte da Jarach, e che costituiscono lo scopo del lavoro, furono istituite al fine di accertare se la « toile » fosse capace di sviluppo nelle piante vaccinate uccise. Il fatto si dimostrò possibile e fece concludere all'A. che:

1° l'immunità acquisita attiva delle giovani piante di fagiuolo vaccinate col liquido colturale di « toile » è legata alla vita delle piante;

2° il liquido vaccinante esplica un'azione contraria — attutita, anche in vitro, dalla diluizione — allo sviluppo del microrganismo: cosa, questa, in contrasto con quanto aveva riscontrato la Zoja (1) per l'*Helminthosporium sativum,* i cui conidi normalmente germinavano nel liquido colturale.

(1) Atti dell'Istituto Botanico della R. Università di Pavia, 1924.

* * *

Il problema, certo. riveste, quanto meno dal punto di vista teorico, interesse; ed è perciò che, per contribuire alle conoscenze ad esso riferentisi, furono elaborate alcune esperienze di cui quì si espongono i primi risultati.

E innanzi tutto, la mia attenzione, venne richiamata sulla natura del vaccino, indi sul modo di somministrazione, infine, sugli effetti della vaccinazione.

Per tali prove furono prescelte forme saprofite o debolmente parassite; e ciò per non impegnarsi, sul momento, con fenomeni di specificità. Fu sperimentato con *Acrostalagmus cephalosporioides*, *Macrosporium commune*, *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea,* coltivati in liquido prevalentemente minerale, privo ad ogni modo di sostanze quaternarie, non ritenendosi adatto, secondo il mio modo di vedere, l'impiego di substrati organici complessi per possibili eventuali fenomeni di adsorbimento da parte di questi rispetto ai prodotti reflui del metabolismo fungino.

Il liquido impiegato fu così costituito da:

nitrato potassico	10
saccarosio	20
fosfato bipotassico	1
cloruro di calcio	0,3
solfato di magnesio	0,3
cloruro sodico	0,1
cloruro ferrico	0,01
acqua	1000

Distribuito in bevute di sufficiente grandezza, vi furono coltivati i germi, a temperatura di termostato (25° C.), per

circa 15 giorni; fino a che, cioè, sulla superficie dei liquidi non si fossero sviluppate estese coperte fungine.

Dalle colture così ottenute si prepararono tre sorta di vaccini costituiti: uno, dal liquido filtrato al Chamberland; il secondo dal filtrato del prodotto della triturazione delle membrane con sabbia silicea e acqua; il terzo dalla poltiglia micelio-sabbia.

Su tali materiali furono eseguite prove di germinazione con semi di Frumento Gentil rosso, Medica e Trifoglio, allestendo in pari tempo due serie di controlli costituiti da semi germinanti o in acqua o nella soluzione nutritiva impiegata per la coltura dei funghi. Non fu fatto uso di particolari germinatoi: i semi per le prove relative ai due primi vaccini vennero messi a germinare su di uno strato di cotone impregnato dei liquidi e disteso in scatole Petri tenute aperte e a temperatura ambiente (10-12° C.).

Giornalmente, o quando era ritenuto necessario, veniva aggiunto liquido per sostituire quello evaporato. Per il terzo vaccino non fu usato cotone, costituendo esso stesso un buon substrato per i semi: veniva soltanto aggiunta acqua per mantenere umida la sabbia.

I risultati avuti da tali prove (v. Tab. I, II, III e grafici in fondo testo) lasciano concludere che:

1° i liquidi di coltura, filtrati di Chamberland, hanno effetto di ritardare la germinazione e di ridurne la percentuale sia per il Frumento che per la Medica e il Trifoglio;

2° i filtrati risultanti dalla triturazione del micelio con la sabbia hanno effetto nullo per la Medica e il Trifoglio, debole per il Frumento;

3° le residue poltiglie micelio-sabbia consentono la nor-

male germinazione dei semi di Frumento, Trifoglio e Medica, eccettuato il caso della *Botrytis* che infettò parte dei semi;

4° nei controlli la germinazione si svolse regolarmente eccetto che per il Frumento germinante nel liquido colturale dei funghi, forse a causa del suo elevato tenore osmotico.

Dei prodotti che abbiamo chiamato in precedenza vaccini, il solo liquido filtrato al Chamberland avrebbe, dunque, azione tossica nei riguardi della germinazione. Tale azione tossica è relazionabile alla presenza di prodotti di rifiuto del metabolismo micelico e non sembra dimostrata da speciali composti estrameabili del micelio vivente.

Ciò collima in gran parte con le esperienze di De Paolis (1) eseguite a mezzo di liquidi provenienti da colture di un *Pythium* sp. In concordanza con lo stesso A. stanno i risultati delle mie successive prove, mediante le quali, come si vedrà, si conferma che l'azione dei liquidi filtrati al Chamberland ha influenza rallentatrice sulla vegetazione. In disaccordo con i risultati di De Paolis è a registrarsi soltanto l'effetto di riduzione verificatosi sulla percentuale dei semi germinanti: effetto attribuibile alle diverse condizioni di esperienza. De Paolis, infatti, non fece germinare i semi in diretto continuo contatto con i liquidi vaccinanti, ma somministrò questi, per tre sole volte, a semi messi a germinare in vasi contenenti terra fertile.

Le esperienze di germinazione sui liquidi vaccinanti e provenienti da colture di *Acrostalagmus*, *Aspergillus*, *Ma-*

(1) Boll. d. R. Staz. di Patologia Vegetale, anno XII, n. 2, 1932.

crosporium, le ho ripetute su Frumento di varietà diversa: Villa Glori, 405 Frassineto, Sigfrido Varhernell. Usai, come in precedenza, gli stessi dispositivi di germinazione limitando però ad una sola volta la somministrazione del liquido vaccinante. La germinazione delle cariossidi trattate con i liquidi filtrati al Chamberland risultò essere:

Liquidi provenienti da colture di:	% di cariossidi germinate		
	Villa Glori	405 Frassineto	Sigfrido
Acrostalagmus	74	100	98
Aspergillus	71	84	80
Macrosporium	80	85	90

L'azione tossica dei liquidi vaccinanti precedentemente constatata è dunque relazionabile alla continua somministrazione di essi: contenendo l'aggiunta di questi entro bassi limiti, ottenibili con minori somministrazioni o maggiori diluizioni, l'azione tossica ne viene attutita. Risultò in pari tempo confermato l'effetto ritardante sulla germinazione già messo in evidenza (Tab. IV, V).

Per quanto riferiscesi allo stato di vegetazione delle piantine in via di sviluppo, questo era, al 15° giorno, il seguente:

A) nei liquidi da *Acrostalagmus* filtrati al Chamberland i semi di Villa Glori e Sigfrido presentavano le radichette bruciate, non penetranti nel cotone, lunghe cm. 1-1,3; i fusticini invece alquanto sviluppati, da cm. 5 a 8,5: radi-

chette bruciate, lunghe cm. 1, mostrò anche il 405 Frassineto con lunghezza massima del fusticino di cm. 4-6.

B) nei liquidi da *Aspergillus* filtrati al Chamberland i semi presentavano in ogni caso l'estremità delle radichette, lunghe cm. 1 - 1,5, bruciate: lunghezza dei fusticini cm. 5.

C) nei liquidi da *Macrosporium* filtrati ad Chamberland le radichette, approfondite nel cotone, non apparirono alterate: misurarono cm. 2. ed i fusticini cm. 6-8.

D) nei liquidi provenienti dalla triturazione del micelio con sabbia, e nella residua poltiglia micelio-sabbia i semi germinarono e svilupparono normalmente.

Da ciò discende che, mentre è confermata l'azione tossica solo per i vaccini provenienti dai liquidi di coltura filtranti al Chamberland, d'altra parte non si ha comportamento sensibilmente diverso degli svariati semi rispetto ai liquidi la cui tossicità è più o meno evidente secondo che questi appartenevano ad una coltura anzichè ad un'altra.

Alcune piantine, provenienti da queste ultime prove, e precisamente da parte di quelle germinate e sviluppate nei filtrati al Chamberland di *Acrostalagmus* e *Macrosporium*, furono trapiantate in vasi di coltura contenenti la soluzione di Knop. Si verificó subito un risveglio ed una ripresa di vegetazione, manifestantisi anche con emissione di nuove radici laterali. Su tali piante, trascorso qualche giorno, fu inoculato a mezzo di leggera ferita nel punto di inserzione di una foglia, piccola parte di micelio fruttificato di *Acrostalagmus* e *Macrosporium*.

Le piantine così trattate, presentanti un discreto stato di vegetazione nel momento dell'innesto dei funghi, peri-

rirono dopo pochi giorni per la penetrazione del micelio nei tessuti corrispondenti alla ferita in via di rimarginarsi.

Un'altra prova fu eseguita con la coppia grano - *Botrytis*. All'uopo feci germinare in acqua alcune cariossidi di Gentil Rosso protraendone lo sviluppo per 12 giorni fino a che, cioè, le giovani piantine non fossero sufficientemente sviluppate.

Indi le piantine, le cui radichette erano lunghe 8 - 10 cm., e i fusticini cm. 6 - 7, furono trapiantate in vasi di coltura contenenti in diverse diluizioni, il liquido vaccinante, cioè, il substrato di coltura della *Botrytis* passato al Chamberland.

In altri termini, si dispose:

N° dei vasi	liquido contenuto nei recipienti di coltura:
1	50 % di filtr-Chamb. + 50 % soluz. Knop.
2	50 » » » + 50 » acqua
3	25 » » » + 75 » soluz. Knop
4	25 » » » + 75 » acqua
5	10 » » » + 90 » soluz. Knop
6	10 » » » + 90 » acqua.
7 } 8 }	solamente soluz. Knop (controllo n. 1)
9	» acqua (controllo n. 2)
10	solo liquido di coltura filtrato al Chamb.

Dopo 15 giorni di coltura si rese ben evidente l'azione ostacolante del filtrato sulla vegetaziane, sia aggiunto all'acqua che alla soluzione nutritiva; e tanto maggiormente

quanto più elevato ne era il contenuto rispetto o all'acqua o alla soluzione di Knop. Lo sviluppo, a differenza di quello dei controlli, apparì mediocre: il culmo, debole, tendeva a flettersi, le radici, a non allungarsi.

Dopo ancora 7 giorni, essendone già trascorsi 34, di cui 22 sotto l'azione del liquido vaccinante, le piantine furono trapiantate in recipienti contenenti soluzione nutritiva nuova di Knop.

Passata una settimana, si verificò una certa ripresa vegetativa delle piantine, ad eccezione di quelle sviluppate nel solo liquido vaccinante, le quali perirono, come perirono, poco dopo, quelle accresciutesi in soluzione contenente 50 % di filtrato e 50 % di acqua.

Fatti trascorrere ancora 15 giorni, tutte le piante furono inoculate con una coltura giovane di *Botrytis*. Al momento dell'inoculazione lo stato di vegetazione di esse era affatto rigoglioso, eccezione fatta per i controlli abbastanza bene sviluppati. Tutte le piante risentivano gli effetti tossici del vaccino, piú o meno, a seconda della maggiore o minore sua diluizione.

L'attecchimento della *Botrytis* ai margini della leggera ferita praticata fu evidente, e presto si manifestarono segni di sofferenza con ingiallimento delle foglie e quindi disseccamento e morte, che sopraggiunse prima nelle piante sottoposte all'azione del vaccino, indi negli stessi controlli la cui maggiore resistenza deve probabilmente relazionarsi alle condizioni di minore debilitazione in confronto delle altre piantine. La penetrazione del micelio della *Botrytis* nei tessuti fu in ogni caso accertata da osservazioni microscopiche eseguite subito dopo la morte delle piante.

* * *

Le prove di cui qui si è riferito non tornano a sostegno della tesi fitoimmunitaria prospettata. Cionondimeno sono lungi dal volere annettere ad esse un valore superiore a quello che presentano, cioè, a volerne generalizzare i risultati. E ciò in quanto un solo reperto o anche pochi reperti — positivi o negativi che siano — non bastano, a mio giudizio, a sostenere un qualsiasi principio dottrinario se, i reperti stessi, non sieno ripetuti similarmente ed alternativamente, nel tempo e nello spazio. Tanto più quando, come nel caso in discussione, si debba operare in condizioni piuttosto artificiali di esperienza e quindi non sia possibile, sempre, di eliminare alcuni fenomeni interferenti con quelli oggetto di esame.

Ormai evidente, piuttosto, mi sembra che apparisca l'azione dei cosidetti vaccini, sia sulla germinazione dei semi, sia sullo sviluppo delle giovani piante. Tale azione, che per i liquidi contenenti i prodotti reflui del metabolismo microrganico, si manifesta tossica (mentre non tossici appaiono i prodotti estrameabili del corpo dei microrganismi) é attutita dalla diluzione.

Ma se, per eliminare siffatta azione tossica (che si manifesta con maggiore o minore debilitazione della pianta, donde una minore generale capacità di reazione in essa all'attacco microrganico) il liquido « vaccinante » deve subire diluizioni, resta a vedere — ancorchè quando un risultato vaccinante dovesse ammettersi — se questo si riduca o addirittura si perda.

[Le lettere *A, B, C,* di cui nelle tabelle, stanno rispettivamente ad indicare: liquido di coltura filtrato al Chamberland, liquido proveniente dalla triturazione del micelio con sabbia e acqua, residuo della triturazione micelio-sabbia].

TABELLA I. — *Germinazione dei semi di Frumento nei substrati vaccinanti.*

		Semi germinanti al giorno										% dei semi nati
		3°	4°	5°	6°	7°	9°	10°	11°	14°	15°	
Controllo 1° (acqua)		—	13	7	15	8	12	15	7	3	—	80
» 2° (soluz. minerale		—	—	2	—	3	1	16	22	—	1	44
Acrostalagmus . . .	A	—	—	—	—	3	4	4	4	1	—	16
	B	—	6	6	5	7	8	10	16	3	2	61
	C	—	—	4	2	19	33	4	17	4	—	83
Aspergillus	A	—	2	3	3	3	—	7	6	—	—	24
	B	—	—	2	1	2	3	8	20	6	2	44
	C	—	19	12	8	12	6	7	13	—	—	77
Macrosporium . . .	A	—	2	—	4	3	3	3	4	1	—	20
	B	—	5	4	4	7	8	5	22	6	4	65
	C	—	20	19	12	6	5	3	5	4	—	74
Botrytis	A	—	—	—	1	4	5	—	—	—	—	10
	B	—	3	5	4	11	19	18	13	7	2	82
	C	—	5	4	13	3	1	—	5	—	—	31

TABELLA II. — *Germinazione dei semi di Erba medica nei substrati vaccinanti.*

Controllo 1° (acqua)		17	23	14	4	2	—	—	2	1	—	83
» 2° (soluz. minerale)		40	21	12	5	2	—	1	—	—	—	81
Acrostalagmus . . .	A	1	8	—	3	4	9	3	—	—	—	28
	B	52	18	6	2	2	3	—	—	2	—	85
	C	—	18	30	—	10	10	—	—	—	—	68
Aspergillus	A	1	—	3	—	1	—	—	—	—	—	5
	B	36	36	8	4	4	1	—	1	1	—	91
	C	37	31	7	3	—	3	—	—	—	—	81
Macrosporium . . .	A	9	26	6	3	4	—	—	—	—	—	48
	B	33	30	10	4	1	2	—	1	3	—	84
	C	58	10	7	—	—	—	—	—	2	—	77
Botrytis	A	4	25	10	7	6	—	—	—	—	—	52
	B	42	19	5	6	1	5	—	2	1	—	81
	C	52	20	7	—	—	—	—	—	—	—	79

TABELLA III. — *Germinazione dei semi di Trifoglio nei substrati vaccinanti.*

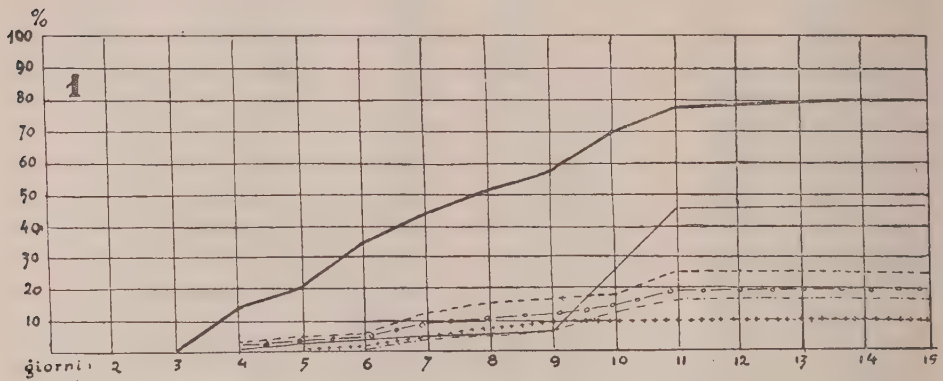
Controllo 1° (acqua)		69	19	7	6	—	1	—	—	1	—	96
» 2° (soluz. minerale)		41	27	16	1	7	—	2	3	1	—	98
Acrostalagmus . . .	A	—	9	16	5	6	6	1	—	—	—	43
	B	61	15	13	2	1	—	2	—	—	—	94
	C	11	25	34	4	6	7	—	3	—	—	90
Aspergillus	A	11	11	7	—	3	—	—	—	2	—	34
	B	64	9	7	2	2	1	4	—	1	—	90
	C	60	28	3	3	—	1	—	—	1	—	96
Macrosporium . . .	A	1	15	14	12	13	6	—	—	—	—	61
	B	27	42	11	6	1	4	—	2	1	—	94
	C	59	20	14	—	—	—	—	—	2	—	95
Botrytis	A	—	10	7	3	6	—	—	—	—	—	26
	B	57	8	16	9	3	4	—	2	—	—	100
	C	45	29	5	5	—	—	—	—	—	—	80

A mio modo di vedere dovrebbe perciò essere pregiudiziale la ricerca con tecnica adatta di un opportuno vaccino che sia capace di dimostrare non solo, e in primo luogo, azione ostacolante dello sviluppo microrganico, ma anche di non creare condizioni di forte deperimento organico nella pianta vaccinata, visto che in questa, a differenza di quanto verificasi nella sieroterapia animale, alla reazione fisiologica del vaccino non fa riscontro una pronta evidente ripresa funzionale.

Ringrazio il Dott. O. Verona per la cortese assistenza voluta prestare a questo mio lavoro.

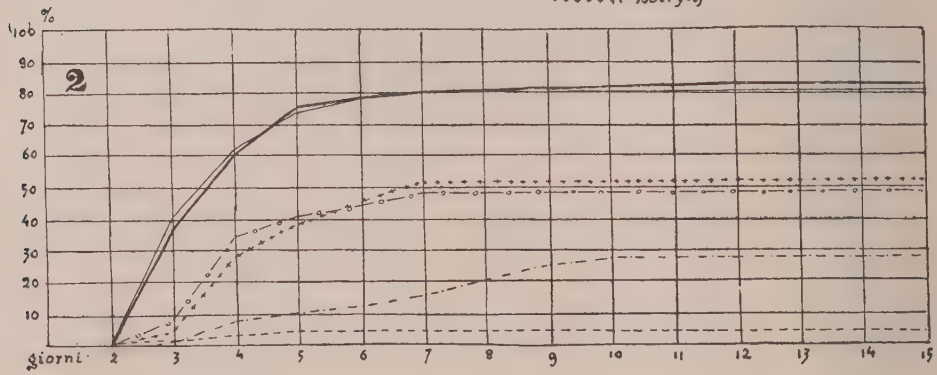
Dal Laboratorio di Patologia Vegetale
del R. Istituto Superiore Agrario di
Pisa, luglio 1932 X

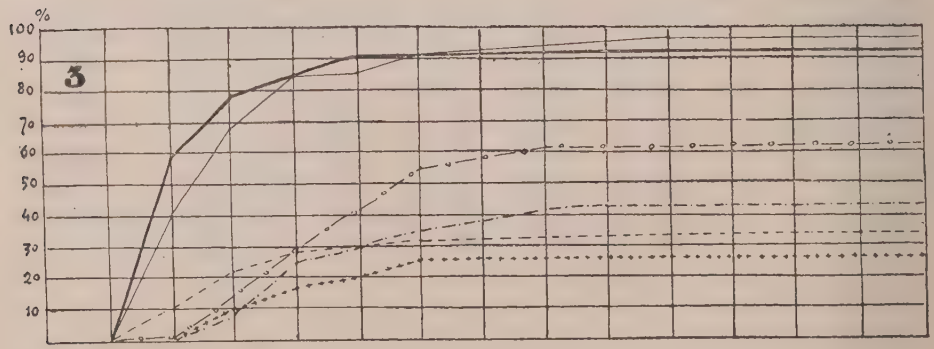
Percentuali di semi germinati (graf. n° 1, grano; graf. n° 2, medica; graf. n° 3, trifoglio) su liquidi di coltura filtrati al Chamberland



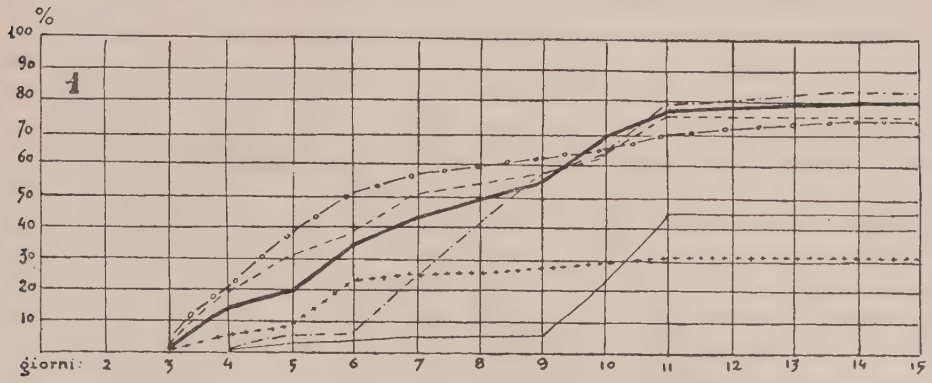
——— Semi germinati in acqua ; ——— id. in soluz. minerale

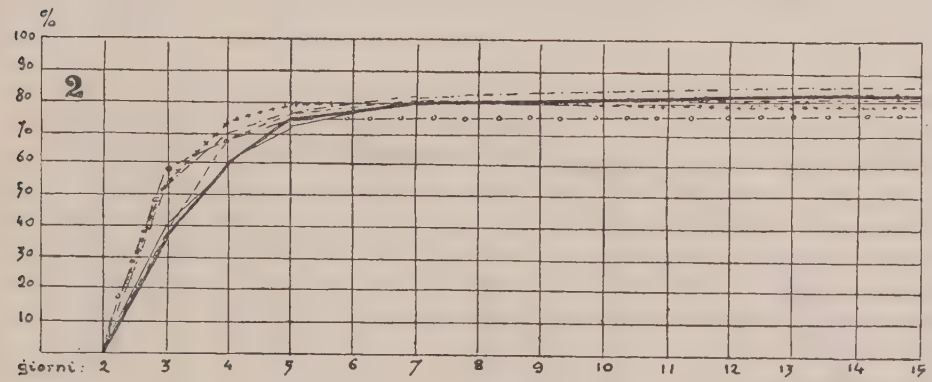
id. in liquidi filtrati al Chamberland da colture di ----- Aspergillus, -·-·- Acrostalagmus, —o—o Macrosporium, ... Botrylis

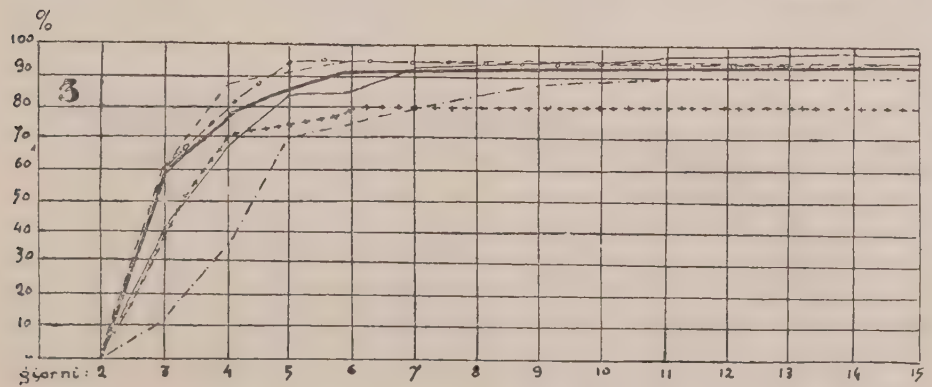




Percentuali di semi germinati (1, grano; 2, medica; 3, trifoglio) sul prodotto della triturazione delle membrane fungine con sabbia e acqua.

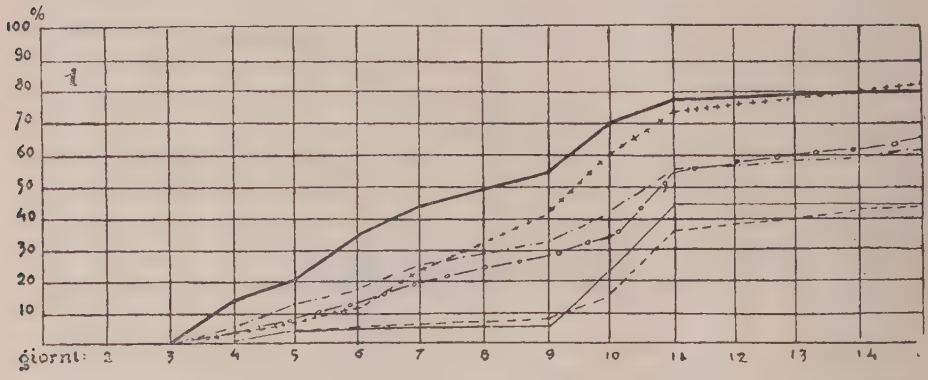


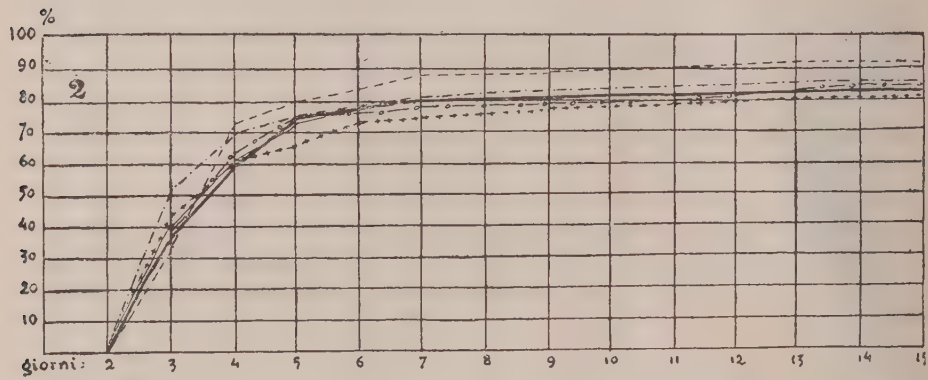


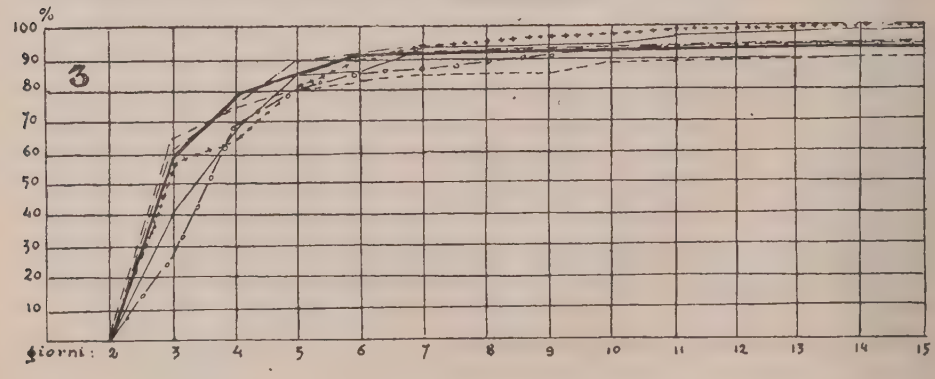


(Per i segni veggasi i grafici precedenti)

Percentuali di semi germinati (1, grano; 2, medica; 3, trifoglio) su liquidi ottenuti filtrando il prodotto della triturazione delle membrane fungine con sabbia e acqua







(Per i segni veggasi i grafici precedenti)